

09/913874

PCT/JP00/00984

日本国特許庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

09/913874

21.02.00

4

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 4月12日

REC'D 07 APR 2000

WIPO

PCT

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第142186号

出願人

Applicant(s):

株式会社京都第一科学

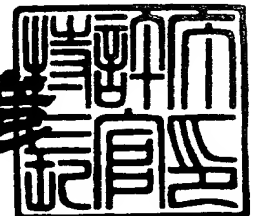
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3019090

【書類名】 特許願

【整理番号】 P582

【提出日】 平成11年 4月13日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12N 9/48

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 株式会社京都第一科学内

 【氏名】 石丸 香

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 株式会社京都第一科学内

 【氏名】 八木 雅之

【発明者】

 【住所又は居所】 京都府京都市南区東九条西明田町 5 7 番地 株式会社京都第一科学内

 【氏名】 米原 聡

【特許出願人】

 【識別番号】 000141897

 【氏名又は名称】 株式会社京都第一科学

 【代表者】 土井 茂

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 糖化アミノ酸遊離酵素の測定方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N末端のアミノ基が糖化されているペプチドもしくはタンパク質を用いる糖化アミノ酸遊離酵素の測定方法。

【請求項 2】 α 位のアミノ基が糖化されており、 α 位のカルボキシル基に検出基が結合しているアミノ酸もしくはペプチドを用いる糖化アミノ酸遊離酵素の測定方法。

【請求項 3】 N末端のアミノ基が糖化されているペプチドもしくはタンパク質より遊離したN末端の糖化アミノ酸を測定する請求項 1～2 のいずれか一項に記載の測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、糖化アミノ酸遊離酵素の測定の方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

糖化アミノ酸遊離酵素は、様々な産業分野において有用な酵素である。例えば、食品中のタンパク質やペプチドの糖化量の測定や、糖尿病の診断および治療等における重要な指標である、ヘモグロビン中の特異的糖化物である HbA1c の測定などに用いることが出来る。

【0003】

糖化アミノ酸遊離酵素は、N末端の α 位のアミノ基が糖化されているペプチド（以下、「糖化ペプチド」という）もしくはN末端の α 位のアミノ基が糖化されているタンパク質（以下、「糖化タンパク質」という）から、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基（ α -Glycated Amino acid、以下、「 α -GA」という）を遊離することができる機能を持っている酵素である。

【0004】

タンパク質やペプチドの糖化量の測定方法は、例えば、以下に示すようにして

行うことができる。タンパク質やペプチドをプロテアーゼで分解し、この分解物と糖化アミノ酸酸化還元酵素とを反応させ、生成物であるアミノ酸や糖などの物質または消費物である酸素等の物質を測定することにより、前記タンパク質やペプチドの糖化量を知ることができる。前記糖化アミノ酸酸化還元酵素としては、例えば、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）がある。前記プロテアーゼとしては、特開平5-192193号公報、特開平7-289253号公報等に関示されているものが使用されている。

【0005】

タンパク質やペプチドを予めプロテアーゼで処理するのは、FAOD等は、N末端のアミノ基が糖化されているアミノ酸や、リジンやアルギニンの側鎖のアミノ基が糖化されているアミノ酸やペプチドに作用し易いが、N末端のアミノ基が糖化されているタンパク質やペプチドに直接には作用し難いからである。特にHbA1cは、糖化部分がβ鎖N末端アミノ酸残基であるため、FAODが作用し易いように、HbA1cを処理できる糖化アミノ酸遊離酵素が必要である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これまで糖化アミノ酸遊離酵素を発見したという報告はなかった。

【0007】

それは、糖化アミノ酸遊離酵素を特異的に測定するための方法に必要な糖化アミノ酸遊離酵素が特異的に反応する基質とそれを特異的に測定する方法がなかったことが原因である。このことより、糖化アミノ酸遊離酵素を発見することができず、また発見した酵素を確認することもできなかった。

【0008】

本発明の目的は、糖化アミノ酸遊離酵素を特異的に測定するための方法を提供することである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、基質として糖化ペプチド、糖化タンパク質、もしくはα位のア

ミノ基が糖化されており α 位のカルボキシル基に検出基が結合しているアミノ酸もしくはペプチドを用いることで、糖化アミノ酸遊離酵素を特異的に測定することができる方法を発見するに至った。遊離されたN末端が糖化されているアミノ酸(α -GA)を検出することで、より特異的の高い測定を行うことができる。

【発明の実施の形態】

【0010】

基質として用いる糖化タンパク質は、N末端のアミノ基をグルコースなどの糖で非酵素的に糖化させることができるものであれば特に限定されない。しかし、特に、糖化タンパク質は、N末端のアミノ基が糖化しているヘモグロビンであるHbA1c、もしくはそれを脱ヘムを行って作製されるグロビンを用いることが望ましい。HbA1cは、HPLCなどで容易に精製することができ、精製したHbA1cをテールの方法(Teale, F. W. J, Biochem, Biophys, Acta, 35, 543, 1959)によりグロビン化することができる。

【0011】

基質として用いる糖化ペプチドは、N末端のアミノ基をグルコースなどの糖で非酵素的に糖化させることができるものであれば特に限定はないが、目的とする糖化タンパク質または糖化アミノ酸の作用させる部分に構造的に近い物を用いる方がより望ましい。

【0012】

しかし、特にペプチドは、構成するアミノ酸残基にアルギニンおよびリジンを含まないものが望ましく、さらにアミノ酸残基数としては2から10が望ましい。例えば、HbA1cを目的とする場合には、

Val-His

Val-His-Leu

Val-His-Leu-Thr-Pro

Val-His-Leu-Thr-Pro-Glu-Glu-Lys-Ser

などのペプチドのValのアミノ基を糖化させた物を基質として用いることが望ましい。

【0013】

また、ペプチドは化学合成によって得ることができるが、糖化タンパク質をプロテアーゼで分解することで得ることもできる。このときに使用する糖化タンパク質とプロテアーゼは特に制限されず、例えば、HbA1cをトリプシンで処理すれば、N末端のアミノ基が糖化されている8ペプチドを得ることができる。

【0014】

α 位のアミノ基が糖化されており α 位のカルボキシル基に検出基が結合しているアミノ酸およびペプチド（以下、「検出性糖化アミノ酸およびペプチド」という）は、 α 位のアミノ基をグルコースなどの糖で非酵素的に糖化させることができるものであればアミノ酸およびペプチドは特に限定しないが、作製のし易さからリジンおよびアルギニン以外のアミノ酸を用いることが望ましい。アミノ酸およびペプチドのカルボキシル基に結合させる検出基は、特異的に検出できるものであれば特に限定はしないが、検出の容易さから遊離すると発色もしくは蛍光を発する化合物を用いることが望ましい。例えば、発色する化合物としては、パラニトロアニリド、パラニトロフェノールやインドールなどを用いることができ、蛍光を発する化合物としては、4-メチルル-クマリル-7-アミドなどを用いることができる。

【0015】

次に、糖化アミノ酸遊離酵素の確認方法は、存在を検査したい検液を前記基質と反応させることにより行われる。反応の条件は通常の酵素反応の条件でよく、例えば、pH5~10、温度15~40℃、10分~48時間であり、緩衝液の種類は特に限定されず、スクリーニングにおいては、pH、温度、基質などは、幅広く各種条件で行うことが望ましい。

【0016】

前記検液は、予め、低分子の物質、特に、アミノ酸、ペプチド、およびそれらの糖化物を、除去しておくことが望ましい。除去する方法としては透析、遠心濾過などが使用できる。

【0017】

前記試料より α -GAを検出する方法としては、TLC、フルクトシルアミノ

酸オキシダーゼ（以下、「FAOD」という）を用いた方法、HPLCなどを用いることができる。また、前記試料より α -GAが遊離した後の物質を測定する方法として、遊離した検出基を測定する方法、遊離したアミノ酸、ペプチドもしくはタンパク質を酵素もしくはHPLCなどで測定する方法などを用いることができる。

【0018】

TLCを用いた方法は、以下に示すような方法で実施できる。試料をTLCを用いて展開することで分離し、これをアミノ酸もしくは糖を検出することで検出する。

【0019】

使用するTLCとその展開条件としては、糖化アミノ酸遊離酵素が特異的に遊離させる α -GAを展開できればよく、望ましくは、添加した基質とそれが分解して精製した物と異なる位置に α -GAが展開できればよい。

【0020】

アミノ酸もしくは糖の検出法としては、ニンヒドリン反応、フルオレスカミンおよびエチレンジアミン硫酸塩などを用いた蛍光検出法などがある。

【0021】

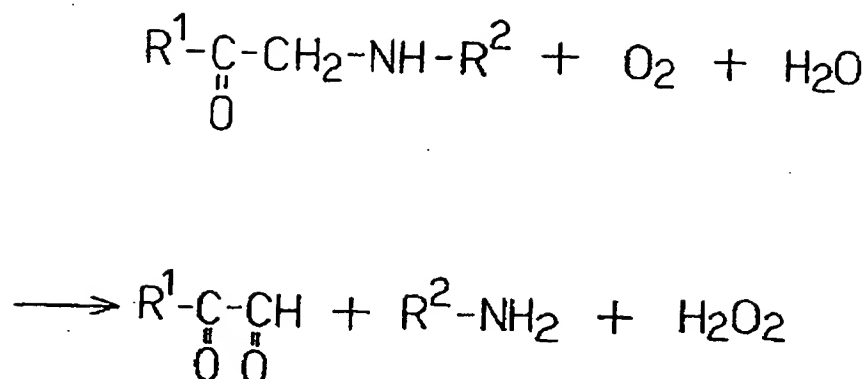
FAODを用いた方法は、FAODが α -GAをアミノ酸と糖とに分解し反応と同時に過酸化水素を生成することを利用して、反応生成物を、測定することで糖化アミノ酸遊離酵素を測定できる。特に、測定系が容易に構築できることから、過酸化水素を直接測定する方法を用いることが望ましい。

【0022】

FAODは、下記式に示す反応が触媒する酵素である。下記式において、R1は、糖のアルドース残基を示し、R2はタンパク質、ペプチドまたはアミノ酸を示す。

【0023】

【化1】



【0024】

前記FAODは、前記反応を触媒するものであれば、特に制限されない。しかし、前記FAODは、リジンまたはアルギニンなどの側鎖のアミノ基が糖化されたアミノ酸およびペプチドに対して活性が低い酵素を使用することが望ましい。例えば、特開昭61-280297号公報、特開平8-336386号公報に開示されているものがある。しかし、前記基質は、リジンまたはアルギニンなどの側鎖のアミノ基が糖化していないか糖化が少ないものを選択して使用することが望ましい。

【0025】

前記FAODの反応は、前記FAODによる α -GAの検出に適した反応条件で行うことができる。通常、pH6~9、温度15~40℃、1~30分であり、緩衝液の種類は特に制限されず、例えば、トリス塩酸緩衝液、EPES緩衝液、PIPES緩衝液等が使用できる。

【0026】

つぎに、前記FAOD反応の結果生じる反応生成物量および消費される酸素量を測定する。前記反応の測定は、測定の容易さから、前記反応によって生じる過酸化水素量を測定することが好ましく、ペルオキシダーゼと酸化により発色する色原体とを用いた測定であることが好ましい。

【0027】

前記色原体の発色（反応液の吸光度）を分光光度計で測定することにより、過酸化水素の濃度を測定でき、これから試料中の糖化タンパク質濃度を知ることが

できる。

【0028】

なお、前記過酸化水素量は、前記ペルオキシダーゼ等を用いた酵素的手法の他に、例えば、電気的手法により測定することもできる。

【0029】

前記酸化により発色する色原体としては、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミンナトリウム(例えば、DA-64:和光純薬社製等)、オルトフェニレンジアミン(OPD)、トリンダー試薬とアミノアンチピリンとを組み合わせた基質等があげられ、特に好ましくは、DA-64である。

【0030】

前記酸化還元反応は通常、緩衝液中で行われ、その条件は、過酸化水素濃度等により適宜決定される。具体的には、反応液中のPOD濃度1~10000IU/リットル、反応温度15~40℃、反応時間1~30分、pH5~9である。また、前記緩衝液は特に制限されず、前記FAODの反応と同様の緩衝液等が使用できる。

【0031】

FAOD反応と測定工程は、前述のように別々に行ってもよいが、同時に行うことも可能である。

【0032】

遊離した検出基を測定する方法としては、分光光度計や蛍光光度計などを使用して測定できる。例えば、パラニトロアニリドやパラニトロフェノールなどは分光光度計を用いて405~410nm付近の吸光度変化を測定し、4-メチル-クマリル-7-アミドなどは蛍光光度計を用いて380nmで励起して460nmで測定することで検出できる。また、ペプチドを用いた場合には、糖化アミノ酸遊離酵素が基質に作用して α -GAを遊離した残りの検出基が結合したアミノ酸もしくはペプチドを、プロテアーゼまたはペプチダーゼなどを用いて分解し、検出基を遊離させることもできる。ペプチダーゼとしては、例えばアミノペプチダーゼおよびズブチリシンなどを用いることができる。

【0033】

FAOD反応と測定の工程および遊離した検出基の測定の工程は、糖化アミノ酸遊離酵素と基質とを反応させる工程と同時に進めても良い。

【0034】

【実施例】

(実施例1および対照例1)

本発明の糖化アミノ酸遊離酵素を特異的に測定するための方法を、土壌より糖化アミノ酸遊離酵素を産生する菌株をスクリーニングを行う場合に適用した例である。

【0035】

この実施例は、本発明の糖化アミノ酸遊離酵素を産生する新菌体の培養液上清と、 α -GAを有する糖化ペプチドとを反応させて、前記糖化ペプチドから α -GAを遊離させた例を以下に記す。

【0036】

(1) 培養方法

以下に示す栄養液体培地を、予め、オートクレーブにより、 121°C で20分間滅菌する。そして、土壌サンプルを滅菌水に懸濁し、これを前記滅菌済みの栄養固体培地に塗布して、 30°C で、48時間培養し、シングルコロニーを作成し、そのうち4コロニーについて、前記滅菌済みの栄養液体培地に添加して、 30°C で、48時間振とう培養(111rpm)を行う。得られた培養液を、10,000rpm、15min、 4°C の条件で遠心分離して、その上清を回収する。以下、上清を試料といい、各のコロニーから得た試料を試料1、試料2、試料3と試料4という。

【0037】

(栄養液体培地)

麦芽エキス (Malt extract: DIFCO社製)	2.0g
D-グルコース (ナカライテスク社製)	2.0g
ペプトン (Bacto peptone: DIFCO社製)	0.1g
蒸留水	100ml

【0038】

(2) 糖化ペプチドの分解反応

(糖化ペプチドおよび糖化アミノ酸の製造方法)

そのアミノ酸配列が、HbA1cβ鎖におけるN末端側アミノ酸配列と同様であるα-アミノ基糖化ペプチドおよびα-GVを、以下のペプチドおよびバリンとグルコースとを用いて、常法により作製する。

【0039】

(ペプチド)

Val-His (ペプチド研究所社製：以下、この糖化物を「F2P」という)

Val-His-Leu (ペプチド研究所社製：以下、この糖化物を「F3P」という)

Val-His-Leu-Thr-Pro (SIGMA社製：以下、この糖化物を「F5P」という)

【0040】

(L-アミノ酸)

Val、LeuおよびHis (ペプチド研究所社製：以下、糖化バリンを「FV」という)

【0041】

(分解方法)

予め、前記各糖化ペプチドを、0.01Mの濃度になるように、蒸留水に溶解して、糖化ペプチド溶液をそれぞれ調製する。そして、前記各糖化ペプチド溶液50μlと、前記試料100μlとをそれぞれ混合し、37℃で一晩反応させた後、これらの反応液を凍結乾燥する。

【0042】

(3) TLC分析

前記糖化ペプチドの分解物を、TLCにより分析し、糖化アミノ酸遊離酵素活性の有無を確認する。なお、使用する試薬および方法を、以下に示す。

【0043】

(薄層プレート)

PreCoated TLC plate SILICA GEL 60 (メルク社製)

【0044】

(検出試薬)

ニンヒドリン (フナコシ社製) を 0.5 体積% の濃度になるように、75 体積% エタノールで溶解する。

【0045】

(展開溶媒)

ブタノール (ナカライテスク社製) と酢酸 (ナカライテスク社製) と蒸留水とを、2 : 1 : 1 の体積割合になるように混合する。

【0046】

(分析方法)

予め、展開距離が 8 cm になるように前記薄層プレートを準備し、前記プレート下端から 1 cm の位置を、サンプルスポットの原線とする。そして、TLC 分析の直前に、前記凍結乾燥した各反応液を、50 体積% エタノール 15 μ l にそれぞれ溶解して、これらをシリンジ (容量 25 μ l) により、前記原線上にスポットする。なお、コントロールとして、前記 FV および各種アミノ酸も、同様にスポットする。そして、予め、前記展開溶媒で飽和された展開槽に、このプレートをいれ、前記原線から約 8 cm の距離まで、前記展開溶媒を上昇させる。なお、前記展開溶媒は、前記プレートが、その下端から約 0.5 cm まで浸かるように入れておく。

【0047】

前記展開後、ドラフト内で完全に風乾させた前記プレートに、前記ニンヒドリン溶液を噴霧してから、予め熱しておいたホットスターラー (100℃) により加熱して、発色試験を行った。

【0048】

試料 1 についての TLC 分析の結果を、図 1 および図 2 に示す。図 1 において、レーン No. 1 はコントロール (FV)、レーン No. 2 はコントロール (L

eu、Val、His)、レーンNo. 3はF2P分解物、レーンNo. 4はF3P分解物であり、図2において、レーンNo. 1はF2P分解物、レーンNo. 2はF5P分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表1に示す。

【0049】

試料2についてのTLC分析の結果を図3に示す。同図中において、レーンNo. 1はコントロール(FV)、レーンNo. 2はコントロール(Leu、Val、His)、レーンNo. 3はF2P分解物、レーンNo. 4はF3P分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表1に併せて示す。

【0050】

試料3についてのTLC分析の結果を図4に示す。同図中において、レーンNo. 1はコントロール(FV)、レーンNo. 2はコントロール(Leu、Val、His)、レーンNo. 3はF2P分解物、レーンNo. 4はF3P分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表1に併せて示す。

【0051】

試料4についてのTLC分析の結果を図5に示す。同図中において、レーンNo. 1はコントロール(FV)、レーンNo. 2はコントロール(Leu、Val、His)、レーンNo. 3はF2P分解物、レーンNo. 4はF3P分解物である。また、同図中において矢印が示すスポットの移動度を、下記表1に併せて示す。

【0052】

【表 1】

図No.	サンプル名	移動度
図1	コントロールFV	0.43
	F2P分解物	0.43
	F3P分解物	0.43
図2	F2P分解物	0.44
	F5P分解物	0.44
図3	コントロールFV	0.46
	F2P分解物	0.46
	F3P分解物	0.46
図4	コントロールFV	0.45
	F2P分解物	ND
	F3P分解物	ND
図5	コントロールFV	0.44
	F2P分解物	ND
	F3P分解物	ND

【0053】

図1、図2および図3ならびに前記表1に示すように、前記試料1と前記試料2により処理した糖化ペプチド分解物において、コントロールFVと同じ移動度でスポットが確認できた（矢印で示すスポット）。また、前記試料1におけるF5P分解物も、FVと同じ移動度でスポットが確認できた（移動度0.46：図示せず）。以上のことから、前記試料1と前記試料2は、糖化ペプチドから α -GAが遊離させることがわかった。これに対し、図4および図5ならびに前記表1に示すように、前記試料3と前記試料4により処理した糖化ペプチド分解物において、コントロールFVと同じ移動度のスポットは確認できなかった（矢印で示す部分）。さらに、前記分解物のスポットが、Valの移動度とは異なることから、前記試料1と前記試料2により遊離されたFVから糖（フルクトース）が乖離されていないこともわかった。また、図1、図2および図3に示すように、

F 2 P 分解物では、F V と H i s のスポットが見られた。F 3 P 分解物および F 5 P 分解物において、F V 以外の分解物（ジペプチドおよびテトラペプチド）のスポットが見られないのは、この T L C の方法では検出されないためと推測できる。

【 0 0 5 4 】

前記試料 1 と前記試料 2 に示すように、本発明を適用して土壌より菌株をスクリーニングを行うことで、目的とする糖化アミノ酸遊離酵素を産生する菌株を発見することが出来た。前記試料 1 と前記試料 2 とを同定した結果、コリネバクテリウム ウレオリティカム KDK1002 (Corynebacterium ureolyticum KDK1002) および、シュードモナス アルカリゲネス KDK1001 (Pseudomonas alcaligenes KDK1001) であった。

【 0 0 5 5 】

（実施例 2 および比較例 2）

この実施例は、実施例 1 および比較例 1 と同じ試料 1、試料 2、試料 3 および試料 4 により糖化ペプチドを処理し、その処理物を F A O D 等を用いた酸化還元反応を行うことにより、前記試料の糖化アミノ酸遊離酵素活性を測定した例である。使用した試薬、その組成および方法を以下に示す。

【 0 0 5 6 】

（50 mM 糖化ペプチド溶液）

前記 F 2 P を、50 mM の濃度になるように蒸留水に溶解した。

【 0 0 5 7 】

（緩衝液 A）

80 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）

【 0 0 5 8 】

（酸化還元反応液 B の組成）

DA 64（和光純薬工業社製）	0.1 mmol / リットル
POD（Type III：東洋紡績社製）	50 KU / リットル
FAOD（キッコーマン社製）	10 KU / リットル

緩衝液 A

80 mmol / リットル

【0059】

前記実施例 1 と同様にして調製した試料 490 μ l と前記糖化ペプチド溶液 10 μ l とを混合し、30℃で一晩反応させ、前記糖化ペプチドの分解を行った。この分解液 25 μ l に前記緩衝液 A 55 μ l を添加した後、前記酸化還元反応液 B 20 μ l を混合して、反応を開始し、主波長 694 nm、副波長 884 nm におけるこの反応液の吸光度を、生化学自動分析装置 JCA-BM8（日本電子社製）を用いて測定した。そして、予め、標準物質として FV を用いて FAOD による反応を行い作成した検量線と、前記吸光度とから、糖化アミノ酸遊離酵素の活性を求めた。この結果を、下記表 2 に示す。なお、トリプシン（シグマ社製）、パパイン（シグマ社製）およびアミノペプチダーゼ（シグマ社製）を 1 g / リットルの濃度になるように精製水に溶解したものを、それぞれ酵素液として用いた以外は、前述と同様にして糖化アミノ酸遊離酵素活性の測定を行ったものを比較例とした。

【0060】

【表 2】

試料	糖化アミノ酸遊離酵素活性
	(U / リットル)
試料 1	1.43
試料 2	0.26

【0061】

表 2 に示すように、前記試料 1 と試料 2 を用いた場合、糖化アミノ酸遊離酵素活性が確認されたが、試料 3、試料 4、トリプシン、パパインおよびアミノペプチダーゼをそれぞれ用いた比較例では、糖化アミノ酸遊離酵素活性は検出できなかった。

【0062】

(実施例 3 および比較例 3)

この実施例は、実施例 1 および比較例 1 と同じ試料 1 および試料 4 により検出性糖化アミノ酸およびペプチドを処理し、検出基の量を測定することにより、前

記試料の糖化アミノ酸遊離酵素活性を測定した例である。使用した試薬、その組成および方法を以下に示す。

【0063】

(検出性糖化アミノ酸およびペプチド溶液)

F-V a l - p N A を V a l - p N A (シグマ社製) とグルコースを用いて定法により作成する。

【0064】

(反応試薬)

F-V a l - p N A	1 m l
50 m M K P B p H 8. 0	2.0 m l

【0065】

前記実施例 1 と同様にして調製した試料 400 μ l と反応試薬 100 μ l とを混合して反応を開始し、この反応液の前記検出性糖化アミノ酸およびペプチドが分解して生じた p N A の濃度変化を示す波長 410 n m における吸光度変化を、生化学自動分析装置 J C A - B M 8 (日本電子社製) を用いて測定しすることで、糖化アミノ酸遊離酵素の活性を求めた。この結果を下記表 3 に示す。

【0066】

【表 3】

試料	糖化アミノ酸遊離酵素活性
	A b s. / 分
精製水	0. 0005
試料 1	0. 0030
試料 4	0. 0005

【0067】

表 3 に示すように、前記試料 1 を用いた場合、糖化アミノ酸遊離酵素活性が確認されたが、試料 4 を用いた比較例では、糖化アミノ酸遊離酵素活性は検出できなかった。

【発明の効果】

このように本発明の N 末端のアミノ基が糖化されているペプチドもしくはタン

パク質より遊離したN末端の糖化アミノ酸を測定する糖化アミノ酸遊離酵素の測定方法により、新規酵素である糖化アミノ酸遊離酵素を発見できるようになった。発見された糖化アミノ酸遊離酵素は、例えば、前記糖化アミノ酸遊離酵素を、FAODを用いた糖化タンパク質の測定方法に使用すれば、糖尿病診断の指標となるHbA1cの測定を正確かつ簡便に行うことができるため、HbA1cの測定を臨床検査等において実用化することが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の一実施例において、試料1を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

【図2】 本発明の前記一実施例において、試料1を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したその他のクロマトグラムである。

【図3】 本発明の前記一実施例において、試料2を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

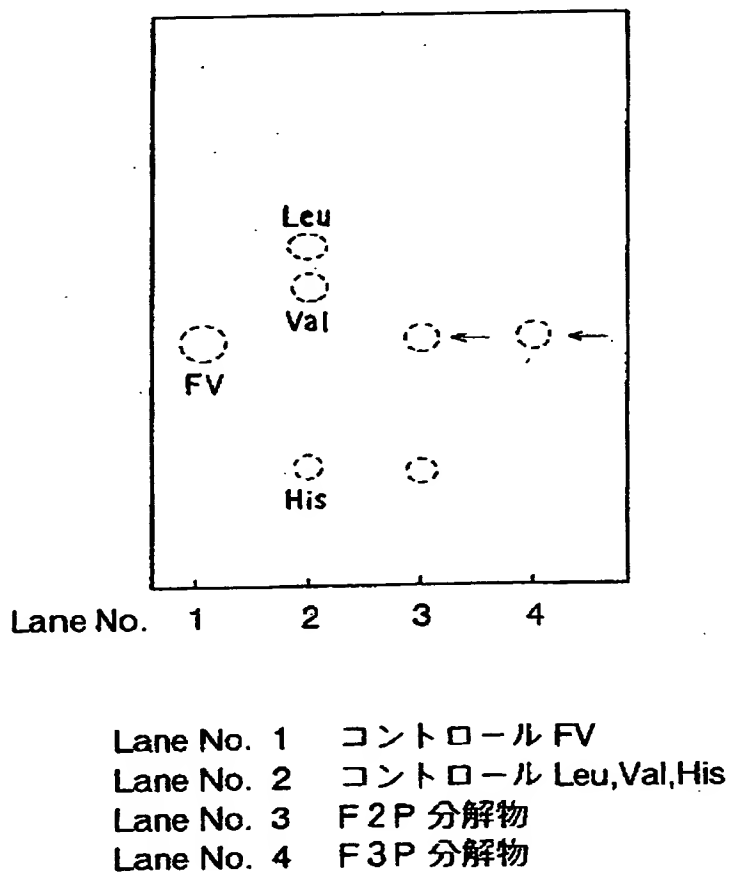
【図4】 本発明の一比較例において、試料3を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

【図5】 本発明の前記一比較例において、試料4を用いて、糖化ペプチドを分解し、その分解物をTLCにより分析したクロマトグラムである。

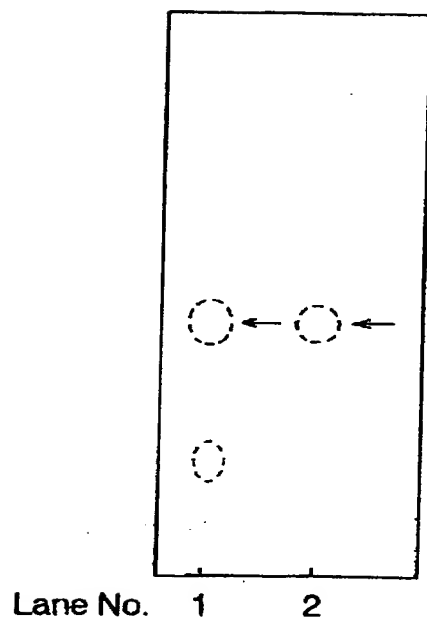
【書類名】

図面

【図 1】

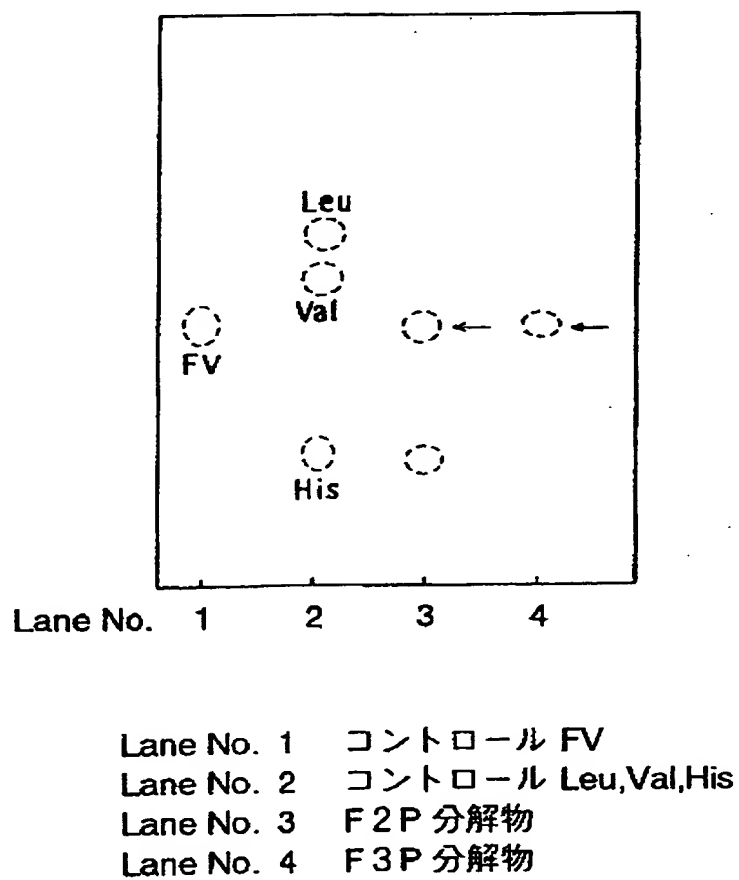


【図 2】

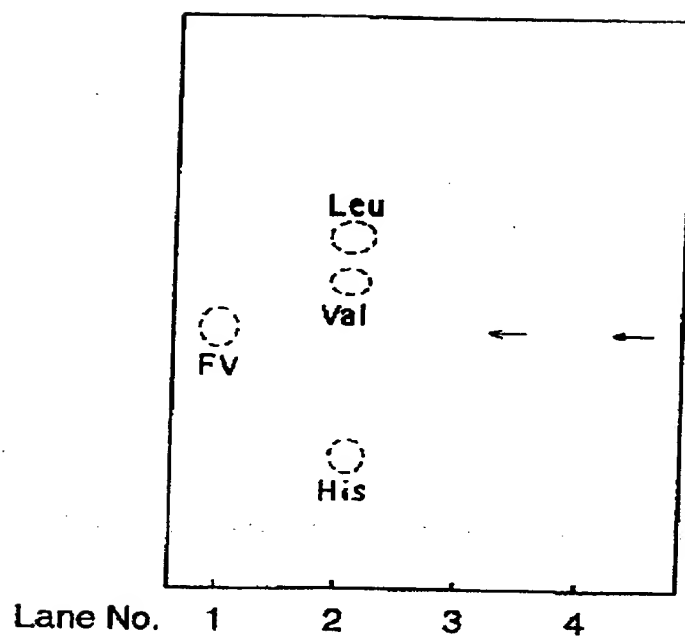


Lane No. 1 F2P 分解物
Lane No. 2 F5P 分解物

【図3】

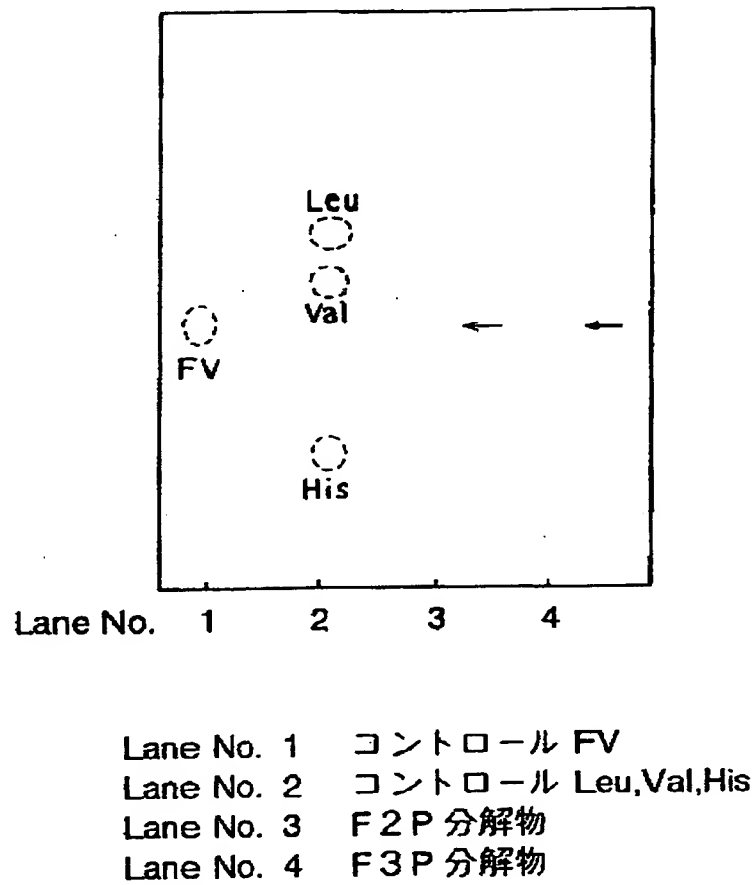


【図 4】



- Lane No. 1 コントロール FV
- Lane No. 2 コントロール Leu, Val, His
- Lane No. 3 F2P 分解物
- Lane No. 4 F3P 分解物

【図 5】



認定・付加情報

特許出願の番号	平成11年 特許願 第142186号
受付番号	29907100030
書類名	特許願
担当官	寺内 文男 7068
作成日	平成11年 8月30日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成11年 4月12日
【特許出願人】	申請人
【識別番号】	000141897
【住所又は居所】	京都府京都市南区東九条西明田町57番地
【氏名又は名称】	株式会社京都第一科学

【書類名】 手続補正書

【提出日】 平成11年 7月 8日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

 【出願番号】 平成11年特許願第142186号

【補正をする者】

 【識別番号】 000141897

 【氏名又は名称】 株式会社京都第一科学

 【代表者】 土井 茂

【発送番号】 046613

【手続補正 1】

 【補正対象書類名】 特許願

 【補正対象項目名】 特許出願人

 【補正方法】 追加

 【補正の内容】

 【その他】 本件手続をしたことに相違ありません。

【手続補正 2】

 【補正対象書類名】 要約書

 【補正対象項目名】 全文

 【補正方法】 追加

 【補正の内容】 1

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 糖化タンパク質等から、 α -アミノ基が糖化されたアミノ酸残基（ α -GA）を遊離する糖化アミノ酸遊離酵素を特異的に測定する方法を提供する。

【解決手段】 糖化アミノ酸遊離酵素を産生する菌体をスクリーニングするため、土壌サンプルを液体培地に添加し、振とう培養を行い、その培養液上清を得る。培養上清に、基質として糖化ペプチド、糖化タンパク質、もしくは α 位のアミノ基が糖化されており α 位のカルボキシル基に検出基が結合しているアミノ酸もしくはペプチドを作用させる。基質より遊離されたN末端が糖化されているアミノ酸（ α -GA）などをTLCやフルクトシルアミノ酸オキシダーゼなどで検出することで、図1のように糖化アミノ酸遊離酵素を産生する菌体を特異的に発見することができる。前記産生菌としては、コリネバクテリウム ウレオリティカムKDK1002（FERMP-17135）およびシュードモナスアルカリゲネスKDK1001（FERMP-17133）などがある。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000141897]

1. 変更年月日

1990年 8月11日

[変更理由]

新規登録

住 所

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

氏 名

株式会社京都第一科学

